

**PENGHASILAN HIRUDIN DARI LINTAH TEMPATAN**  
**(Hirudo medicinalis)**

Fazilah Abd Latif dan Norizah Salim  
Jab. Kejuruteraan Bioproses  
Fakulti Kejuruteraan Kimia dan Kejuruteraan Sumber Asli  
Universiti Teknologi Malaysia  
Kuala Lumpur, Malaysia

**Abstrak**

Hirudin adalah sejenis protein yang diperolehi dari Lintah tempatan (Hirudo medicinalis), berfungsi sebagai agen anti-pembekuan darah semulajadi. Dari beberapa penyelidikan, telah dibuktikan bahawa hirudin boleh berfungsi secara berkesan menyekat pembentukan thrombus bagi menghalang proses pembekuan darah. Perkembangan pesat dalam bidang Bioteknologi dan Biologi Molekul, yang melibatkan teknik-teknik DNA Rekombinan dan proses penulinan protein, membolehkan hirudin diperolehi, ditulin dan dihasilkan secara skala besar. Kebolehdapatan hirudin secara skala besar dalam pasaran membolehkan bahan ini digunakan dengan meluas dalam bidang perubatan untuk merawat beberapa jenis penyakit thrombotik dan boleh digunakan semasa pembedahan dijalankan.

**Pengenalan**

Lintah (Hirudo medicinalis) adalah haiwan invertebrata dari kelas Hirudenia dalam filum Annelida (Euchsbaum R., 1976). Lintah mengeluarkan protein hirudin dari kelenjar liurnya ketika menghisap darah mangsa (Joseph G.E. & Robert W.H. 1981). Hirudin ini berfungsi sebagai agen anti-pembekuan

darah atau perencat thrombin yang sangat spesifik (Baskova T.P., et al., 1983). Thrombin adalah enzim yang merangsang pembekuan darah. Dari beberapa penyelidikan, telah dibuktikan bahawa hirudin boleh berfungsi secara berkesan menyekat pembekuan thrombus dimana nilai  $K_i$  hirudin terhadap thrombin adalah  $0.82 \times 10^{-12}$  mol/l (Dodt J., et al., 1984).

Hirudin adalah protein yang sangat stabil terhadap suhu dan pH yang tinggi. Protein hirudin dari lintah Eropah mengandungi 65 atau 66 jujukan asid amino dengan 3 ikatan di sulfur (Harvey R.P., et al., 1986). Ketiga-tiga ikatan disulfur itu terletak di dalam kawasan 39 residu pertama di terminal amino. Terminal karboksil pula sangat asidik dengan 5 asid amino yang asidik, 4 Glu dan 1 Tyr-SO<sub>3</sub>H, di 9 residu yang terakhir. Tapak aktif adalah dimana residu Lys di apit oleh 2 Pro. Struktur ini yang dikatakan memainkan peranan penting dalam interaksi hirudin-thrombin (Chang J.-Y., 1983).

Tujuan utama penyelidikan ini adalah untuk mendapatkan maklumat mengenai variasi spesies protein hirudin daripada lintah tempatan dan membandingkan dengan maklumat variasi dari spesies hirudin yang didapati dari lintah benua Eropah.

Maklumat ini dapat digunakan untuk penghasilan hirudin dengan skala besar secara lebih berkesan dengan penggunaan teknik pengklonan DNA dan proses pemindahan plasmid rekombinan ke dalam yis atau bakteria. Diperingkat terakhir untuk mendapatkan jumlah hirudin secara skala besar, proses fermentasi sel-sel rekombinan yis dilakukan didalam fermenter

### Methodologi

#### Ekstrak lintah

##### Bahan

Lintah (Hirudo medicinalis), penimbang Galaxy 400 OHAUS, Stainless steel mug, nitrogen cair, mortar dan pestel, high speed centrifuge Sigma 3K20 B.Braun dan penimbal posfat (pH 7.0, 0.1 M  $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  dan 0.15M NaCl dari MERCK ).

##### Kaedah

Lintah yang hendak diekstrak ditimbang terlebih dahulu dan ia diekstrak dengan merendarkannya didalam nitrogen cair supaya ia membeku dan terhidrat. Selepas lintah terhidrat ia ditumbuk didalam mortar dengan pestel. Semasa proses menumbuk, nitrogen cair terus di tuang supaya lintah tersebut tetap terhidrat sehingga menjadi serbuk. Setelah selesai kerja menumbuk, serbuk lintah dibiarkan mencair dan bagi setiap gram berat lintah 10ml penimbal posfat ditambah dan

dihomogenkan. Ekstrak ini kemudiannya diempar pada kelajuan 15 000 rpm selama 30 min. Pelet yang termendak diasingkan untuk ekstraksi seterusnya manakala supernatant diambil untuk ujian kepekatan protein dan ujian seterusnya.

### Ujian Protein

#### Bahan

Tabung uji, mikropipet, dye concentrated reagen protein assay dari BioRad, plastik cuvet dan spektrofotometer LKB dari Novaspec.

#### Kaedah

Ujian Protein dilakukan ke atas supernatant dari ekstrak lintah untuk menentukan kepekatan protein yang diperolehi dari setiap gram lintah. Ujian yang dilakukan adalah mengikut konsep Bradford dengan menggunakan dye reagen yang disediakan oleh Bio-Rad. Bacaan O.D. diambil pada jarak gelombang 595 nm .

### Ujian Dialisis

#### Bahan

Spectrapor membrane tubing #3 dari Spectrum Medical Ind. Inc., bikar, magnetic bar, hot plate Cimarec 2 dari Thermolyne, penimbal TSM (pH 8.0, 10mM Tris-HCl, 0.3 mM Succinic Acid dan 10mM MgCl<sub>2</sub> dari Sigma) dan penimbal protein

(penimbal urea : pH 6-7 , 6M urea, 50mM  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ , 12mM methylamine dan 0.8mM B-mer-ETOH dari MERCK)

#### Kaedah

Dialisis dilakukan dengan memasukkan 20 ml sampel (supernatant ekstrak lintah) ke dalam tiub dialisis dan dikacau didalam larutan penimbal TSM selama 3 jam sebanyak 3 kali didalam bilik sejuk. Sampel kemudiannya dikacau didalam penimbal protein selama 12 jam. Selepas dialisis sampel dialiquotkan untuk digunakan didalam elektroforesis.

#### **Nyahgaram (desalting)**

##### Bahan

Econo-Pac 10DG Column dari BioRad, Fraction Collector Model 2110 dari BioRad, penimbal TSM (pH 8.0, 10mM Tris-HCl, 0.3mM Succinic Acid dan 10mM  $\text{MgCl}_2$  dari Sigma) dan spektrofotometer Shimadzu UV-160.

##### Kaedah

Ujian nyahgaram yang dijalankan adalah mengikut konsep kromatografi mudah dimana gel polyacrilamide yang digunakan didalam column akan mengasingkan dan mengeluarkan komponen-komponen dari sampel mengikut berat masing-masing. Dalam proses ini, Econo-Pac 10DG Column dari Bio-Rad digunakan.

Penimbang yang digunakan adalah TSM dan fraksi sebanyak 1ml dikumpul untuk dibaca O.D.nya pada jarak gelombang 280nm. Fraksi yang mempunyai bacaan O.D tinggi dikumpul untuk proses elektroforesis.

### **Pengasingan dengan Rotofor (Bio-Rad)**

#### Bahan

Rotofor dari BioRad, Power supply, air pump dan fraction collector digunakan dari Dr. Ekhsan Fakulti Perubatan Universiti Malaya.

#### Kaedah

Pengasingan dengan Rotofor dilakukan dengan mengikut konsep pengasingan pH atau  $P_i$ . Fraksi dari Rotofor dibaca O.D. pada jarak gelombang 280nm. Fraksi bacaan O.D. yang tinggi dikumpul untuk proses elektroforesis.

### **Elektroforesis**

#### Bahan

larutan-larutan untuk gel:

Monomer solution (30%T, 2.7% C Bis), Resolving gel buffer (1.5M Tris-Cl pH 3.8), 10% SDS, 10% Ammonium Persulfate, TEMED dan Tank buffer (pH 8.3, 0.025M Tris, 0.192M glycine, 0.1% SDS) yang disediakan berasingan dan dicampur dalam peratus yang tertentu untuk membentuk gel Laemmli 10% T, 2.7% C.

Treatment buffer 2x:

0.125 M Tris-Cl, 4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mer-ETOH, pH6.8

lain-lain:

kaki retort, piring alas, 2 keping kaca, peruang dan sesikat, klip, 1% Agarose, Tangki Elektroforesis- Vertical Electrophoresis Gel System Model V16 ERL, Power Supply- Model 250 ERL, besen besar, pengaduk- Luckham Multimix Major dan Drybath- Dribath Thermolyne.

Staining:

Coomassie Blue R250: 0.125% Coomassie blue, 50% Methanol dan 10% acetic acid dari Sigma, BDH dan MERCK.

Destaining:

Solution I: 50% methanol dan 10% acetic acid

Solution II: 5% methanol dan 7% acetic acid

#### Kaedah

Sampel yang akan digunakan didalam elektroforesis dirawat terlebih dahulu dengan mencampurkan 1 bahagian sampel dengan 1 bahagian 2x treatment buffer, direndam dalam suhu 100 °C selama 90 saat dan disejukkan sertamerta sebelum digunakan.

Ujian elektroforesis dilakukan dengan menggunakan 2 keping kaca yang dipisahkan oleh 3 peruang tepi dan 1 sesikat, dan diapit oleh 4 klip dibahagian luarnya. Set in kemudiannya didirikan dengan kaki retort. 1% Agarose cair digunakan sebagai 'sealer' untuk menutup semua ruang kosong supaya

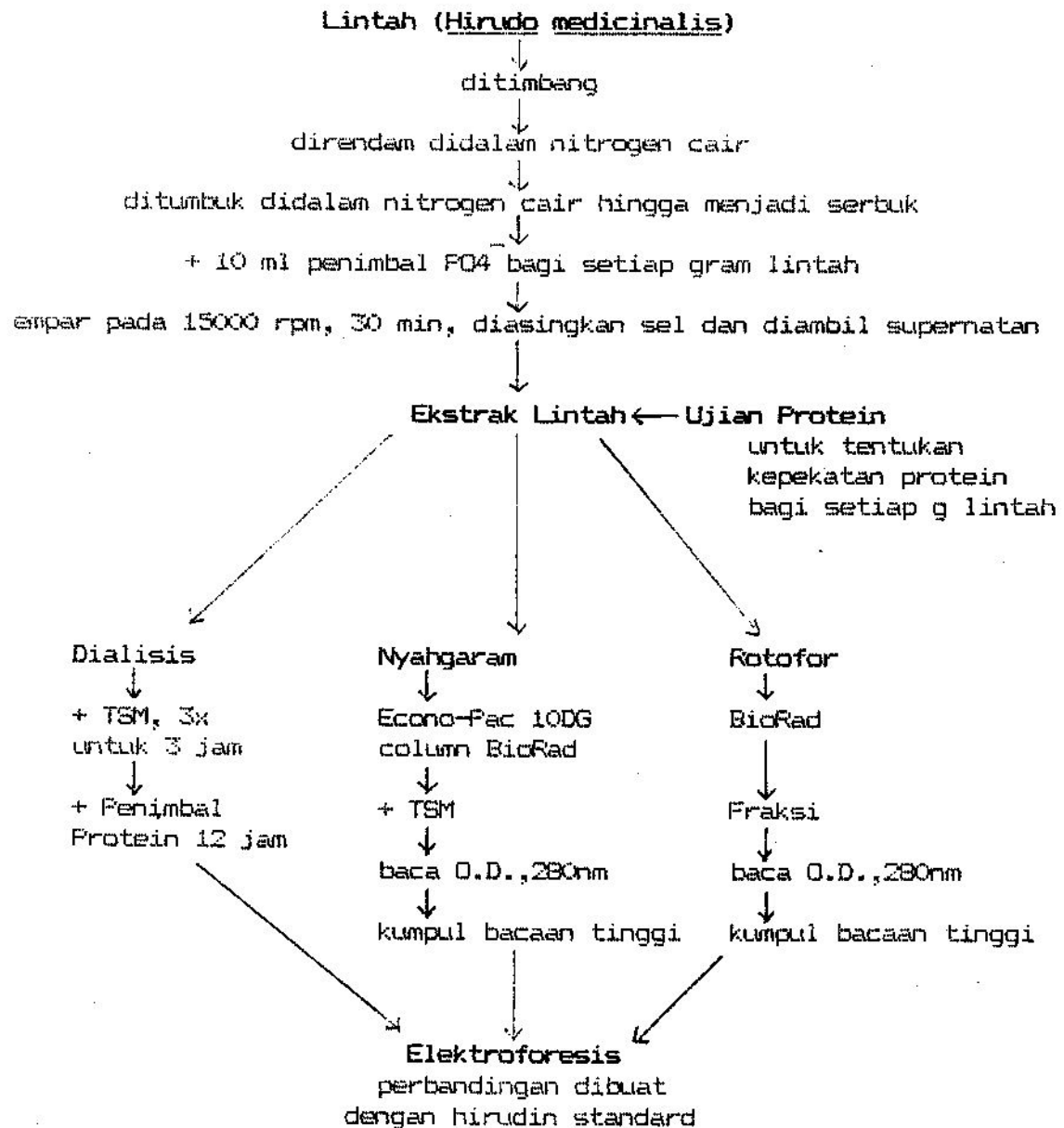
tiada kebocoran berlaku. Selepas Agarose beku, Leammi gel: dimasukkan dengan menggunakan pastuer pipet sehingga penuh. Selepas gel polimerise, peruang bawah dan sesikat dikeluarkan dan dipasang kepada sistem elektroforesis yang takungnya telah dipenuhi dengan tank buffer.

Sebelum sampel dimasukkan ke dalam perigi-perigi yang terbentuk oleh kedudukan sesikat, pre run ke atas sistem dilakukan terlebih dahulu dengan kuasa 70 Volt. selama 30 min. Kemudian sampel diisi ke dalam perigi yang tersedia dan kontrol (hirudin standart) diisi sebagai perbandingan. Kuasa 70 Volt dijalankan selama 40 min dan diikuti oleh kuasa 150 Volt. selama 90 min.

Selepas elektroforesis, gel dikeluarkan dari kepingan kaca dan dimasukkan ke dalam besen persegi dan ditambah pewarna untuk proses staining dengan Coomassie Blue R250 . Besen in kemudiannya diletakkan diatas pengaduk selama 12 jam dan proses destaining dilakukan untuk membuang pewarna dari gel dengan larutan destaining II dicampurkan selepas sahaja proses staining dan diletakkan diatas pengaduk untuk membuang saki baki pewarna dan apabila larutan destaining telah bertukar menjadi biru, larutan baru dicampurkan. Proses ini diulang sehingga gel menjadi jernih akhir sekali larutan destaining I dicampurkan selepas gel dimasukkan ke dalam piring gel dan ditutup untuk disimpan. Perbandingan dibuat dan dicatatkan.



## CARTA ALIR UNTUK EKSTRAK LINTAH



### Hasil dan Pembincangan

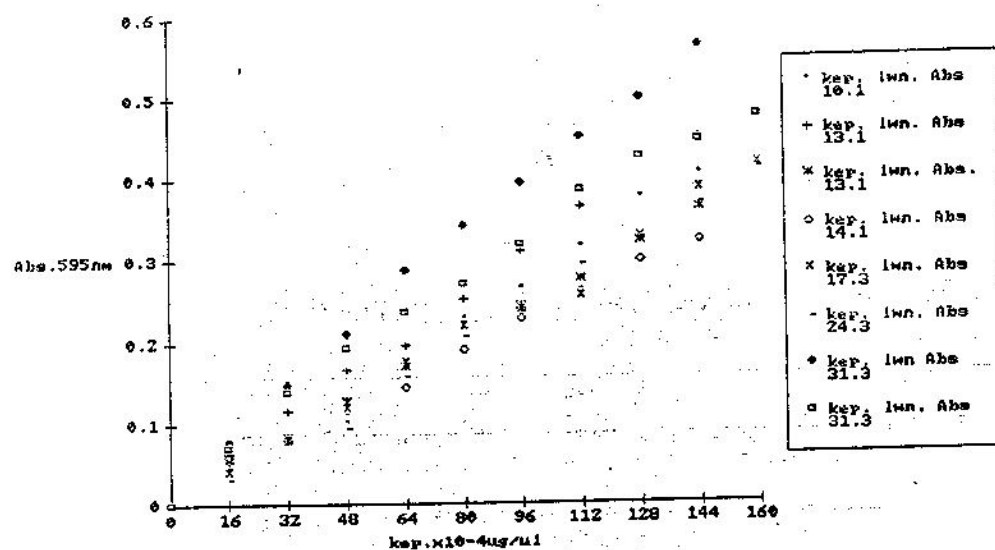
Lintah (Hirudo medicinalis) diperolehi dari Lubuk Lintah, Jelai, Negeri Sembilan. Di makmal, lintah disimpan didalam balang plastik lutsinar yang berisi air kolam dan ditutup dengan kain untuk memudahkan pengudaraan.

### Ujian Protein

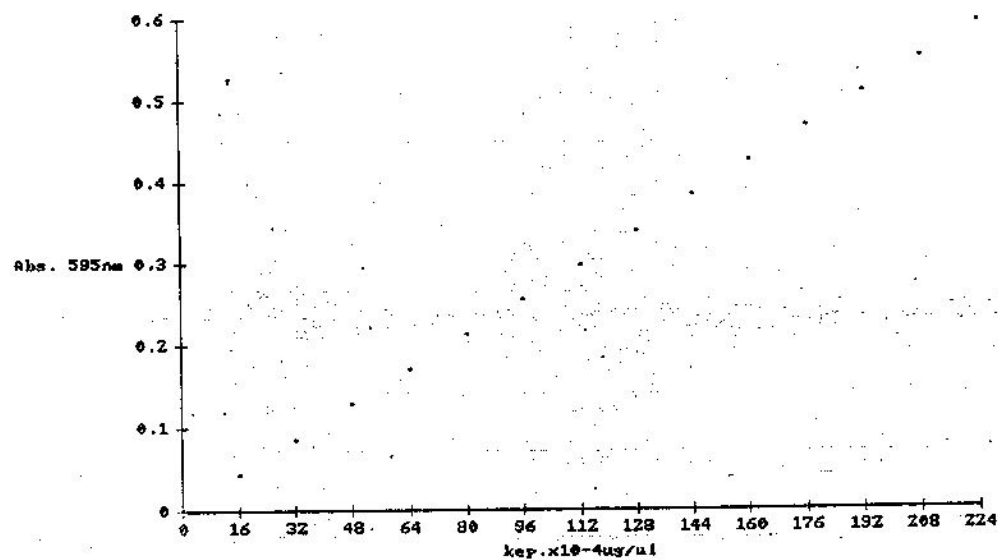
Ujian untuk menentukan kepekatan protein per gram lintah dilakukan terhadap ekstrak lintah dan Protein BSA ( Bovine Serum Albumin dari Sigma ) sebagai perbandingan. dari graf piawai BSA dan graf Q.D. ekstrak lintah jumlah protein per gram lintah adalah 7.566 ug.



LINTAH TEMPATAN (Hirudo medicinalis).



Graf 1.1

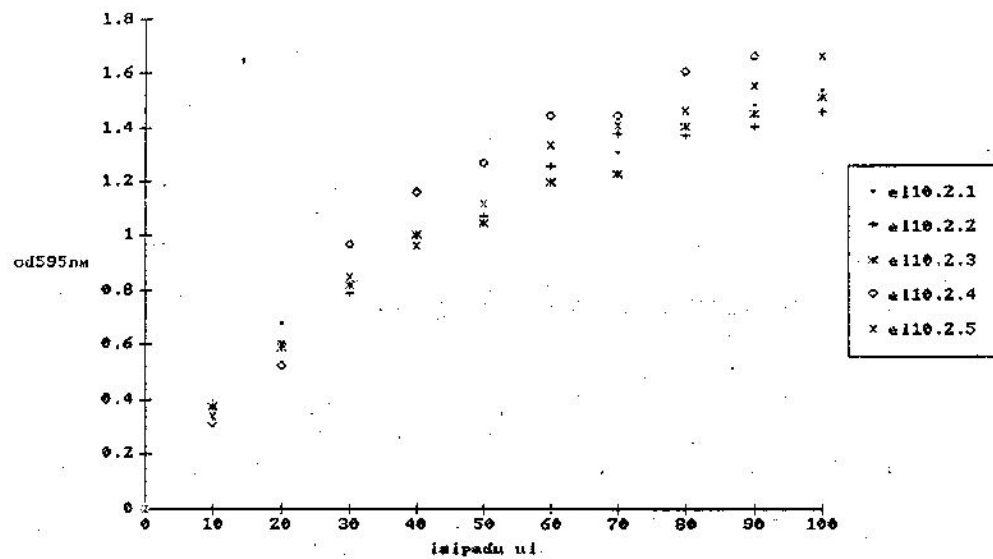


Graf 1.2

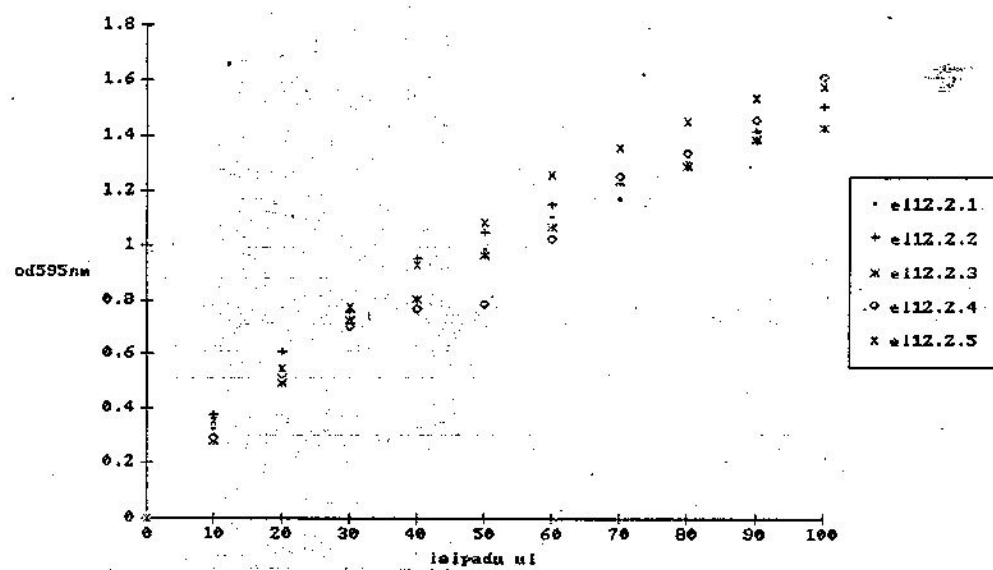
Graf 1 : Graf piawai bagi Optical Density lawan kepekatan Protein BSA

Graf 1.1 : Graf O.D. lawan kepekatan Protein BSA

Graf 1.2 : Graf piawai yang digunakan.



Graf 2.1

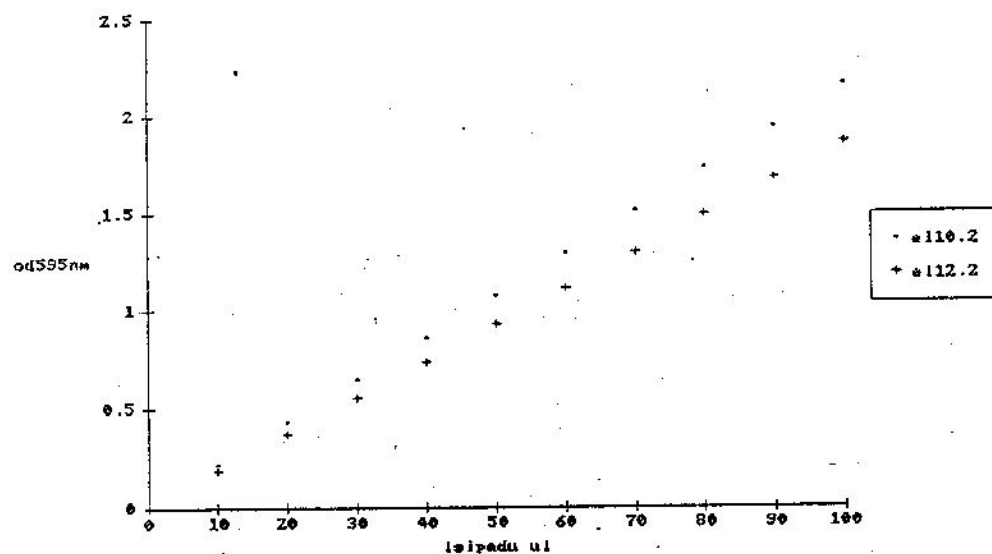


Graf 2.2

Graf 2 : Graf bagi Optical Density lawan isipadu ekstrak lintah

Graf 2.1 : Graf bagi O.D. lawan isipadu ekstrak lintah pada 10.2.1992

Graf 2.2 : Graf bagi O.D. lawan isipadu ekstrak lintah pada 12.2.1992



Graf 2.3

Graf 2 : Graf bagi Optical Density lawan isipadu ekstrak lintah

Graf 2.3 : Graf purata bagi O.D. lawan isipadu ekstrak lintah pada 10.2.1992 dan 12.2.1992

Proses dialisis, nyahgaram dan pengasingan dengan Rotofor adalah proses rawatan yang dilakukan sebelum elektroforesis iaitu satu proses penulenan terhadap ekstrak lintah sebelum penulenan selanjutnya dengan HPLC (High Pressure/Performance Liquid Chromatography) dan penjujukan asid amino hirudin boleh dilakukan.

### Kesimpulan

Jumlah protein yang diperoleh per gram lintah yang diekstrak adalah 7.566 ug. Setakat ini kerja penyelidikan adalah ditahap penulenan hirudin dengan elektroforesis.

### Rujukan

Baskova, T.P. et al., 1983, Hirudin from Leech Heads and Whole Leech and Pseudo-Hirudin from Leech Bodies, Thrombosis Research, Vol. 30, 459-467

Buchbaum, R., 1976, Animals without backbone. 2nd Edition. the University of Chicago Press. Chicago. m.s. 233-235

Chang, J.-Y., 1983, The Functional Domain of Hirudin, a Thrombin specific Inhibitor, FEBS Letters, Vol. 164 #2, 307-313

Dodt, J., et al., 1984, The Complete Amino Acid Sequence of Hirudin, a Thrombin Specific Inhibitor. FEBS Letters, Vol. 165 #2, 180-183

Harvey, R.P., et al., 1986, Cloning and Expression of a cDNA Coding for the Anticoagulant Hirudin from the Bloodsucking Leech, Hirudo medicinalis., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol 83, 1084-1088

Joseph, G.E. and Robert W.H., 1981, Invertebrate Zoology, Macmillan Publishing Co. New York.